

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-099902

(43)Date of publication of application : 16.04.1996

(51)Int.Cl. A61K 39/395
A61K 39/395

(21)Application number : 06-259654

(71)Applicant : CHUGAI PHARMACEUT CO LTD

(22)Date of filing : 30.09.1994

(72)Inventor : KONO MICHIO

(54) IMMATURE TYPE MYELOMA CELL TREATING AGENT CONTAINING IL-6 RECEPTOR AS ACTIVE INGREDIENT

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain an immature type myeloma cell treating agent inhibiting survival of immature type myeloma cell which becomes a main body of a cell group exhibiting resistance to a chemotherapeutant.

CONSTITUTION: This immature type myeloma cell-treating agent contains an interleukin-6 receptor (IL-6R) antibody. A monoclonal antibody derived from mammal is preferably used as the IL-6R antibody and the antibody includes PM-1 antibody, AU 12-20 antibody, AUK146-15 antibody, especially preferably human PM-1 antibody. IL-6R antibody is bound to IL-6R.

Thereby, the bond of IL-6 with IL-6R is inhibited and a signal transmission of IL-6 is blocked and biological activity of IL-6 is inhibited and survival of immature type myeloma cell in which survival is kept by IL-6 is inhibited and eradicated.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-99902

(43) 公開日 平成8年(1996)4月16日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 39/395	ADU T			
	A E D E			

審査請求 未請求 請求項の数9 F D (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願平6-259654	(71) 出願人	000003311 中外製薬株式会社 東京都北区浮間5丁目5番1号
(22) 出願日	平成6年(1994)9月30日	(72) 発明者	河野 道生 広島県広島市南区仁保3丁目35-5
		(74) 代理人	弁理士 石田 敬 (外3名)

(54) 【発明の名称】 I L - 6 レセプター抗体を有効成分とする未熟型骨髓腫細胞治療剤

(57) 【要約】

【目的】 新規な、未熟型骨髓腫細胞治療剤の提供。

【構成】 インターロイキン-6 レセプター抗体を有効成分とする未熟型骨髓腫細胞治療剤。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 インターロイキン-6レセプター抗体を有効成分とする未熟型骨髓腫細胞治療剤。

【請求項2】 前記未熟型骨髓腫細胞が、化学療法剤抵抗性であることを特徴とする請求項1の未熟型骨髓腫細胞治療剤。

【請求項3】 前記未熟型骨髓腫細胞が、VLA-5⁻MPC-1⁻の表面抗原を有することを特徴とする請求項1の未熟型骨髓腫細胞治療剤。

【請求項4】 前記インターロイキン-6レセプターがヒトインターロイキン-6レセプターであることを特徴とする請求項1の未熟型骨髓腫細胞治療剤。

【請求項5】 前記インターロイキン-6レセプター抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項1の未熟型骨髓腫細胞治療剤。

【請求項6】 前記インターロイキン-6レセプター抗体がヒト型化抗体であることを特徴とする請求項1の未熟型骨髓腫細胞治療剤。

【請求項7】 前記インターロイキン-6レセプター抗体がPM-1抗体であることを特徴とする請求項1の未熟型骨髓腫細胞治療剤。

【請求項8】 前記インターロイキン-6レセプター抗体がヒト型化PM-1抗体であることを特徴とする請求項1の未熟型骨髓腫細胞治療剤。

【請求項9】 インターロイキン-6レセプター抗体を有効成分とする未熟型骨髓腫細胞の生存阻害剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はインターロイキン6レセプター抗体を有効成分とする化学療法剤抵抗性である未熟型骨髓腫細胞治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術】骨髓腫は形質細胞が悪性化した腫瘍で、骨髓を増殖の場として複数の部位で発生する腫瘍である。骨髓腫細胞の主要な増殖因子として、インターロイキン6 (IL-6) が有力な候補として考えられている (Kawanoら、Nature, 332, 83, 1988; Klcinら、Blood, 73, 517, 1989)。

【0003】IL-6はB細胞刺激因子2あるいはインターフェロンβ2等と呼称されたサイトカインである。IL-6はBリンパ球系細胞の活性化に関与する分化因子として発見され (Hiranoら、Nature, 324, 73, 1986)、その後種々の細胞の機能に影響を及ぼす多機能サイトカインであることが明らかとなった (Akiraら、Adv. in Immunology, 54, 1, 1993)。

【0004】IL-6は、細胞上で二種のタンパク質を介してその生物学的活性を伝達する。一つは、IL-6が結合する分子量約80KDのリガンド結合性タンパク

質、IL-6レセプター (IL-6R) である。IL-6Rは、細胞膜を貫通して細胞膜上に発現する膜結合型の他に、主にその細胞外領域からなる可溶性IL-6R (sIL-6R) として存在する。もう一つは非リガンド結合性のシグナル伝達に係わる分子量約130KDのgp130である。IL-6とIL-6RはIL-6/IL-6R複合体を形成し、次いでもう一つの膜タンパク質gp130と結合することにより、IL-6の生物学的活性が細胞に伝達される (Tagaら、J. Exp. Med. 196:967, 1987)。

【0005】Kawanoらは、VLA (very late activation antigen)-5あるいはMPC (mature plasma cell)-1 (Huangら、Blood 82, 3721, 1993、特開平6-86688) 等の骨髓腫細胞上の表面抗原により、骨髓腫細胞がVLA-5陰性 (-) MPC-1⁻の未熟型骨髓腫細胞、VLA-5⁻MPC-1陽性 (+) の中間型骨髓腫細胞およびVLA-5⁺MPC-1⁺成熟型骨髓腫細胞に分けられることを報告した (Blood, 82, 564, 1993)。

【0006】また、このうち未熟型骨髓腫細胞が、化学療法剤に治療抵抗性を示す細胞集団の主体であることが知られている (Kawanoら、第56回日本血液学会総会要旨集、261頁、641, 1994)。これまで、IL-6R抗体を加えることにより、一般的に骨髓腫細胞の増殖が抑制されること (Gotoら、Biotherapy 7, 655, 1993) およびIL-6が未熟型骨髓腫細胞の増殖を刺激すること (Kawanoら、Blood, 82, 564, 1993) が知られていた。

【0007】しかしながら、これら知見は骨髓腫細胞の増殖を指標としており、骨髓腫の治療において重要であると考えられている化学療法剤抵抗性の主体をなす未熟型骨髓腫細胞の根絶を示唆するものではなかった。また、これまでIL-6R抗体が未熟型骨髓腫細胞の根本的な治療剤に有用であるかについてはなんらデータもなく、未熟型骨髓腫細胞の生存自体に直接関与しているか否かは依然として不明であった。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】化学療法剤抵抗性の主体をなす未熟型骨髓腫細胞に対し、これまでその根本的な治療に有効である薬剤は見出されておらず、未熟型骨髓腫細胞を根絶する効果を有する薬剤の登場が待たれていた。従って本発明は未熟型骨髓腫細胞に対する治療剤を提供しようとするものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究した結果、IL-6R抗体が化学療法剤抵抗性の主体をなす未熟型骨髓腫細胞の生存を阻

害することを見出し、本発明を完成させた。すなわち、本発明は、未熟型骨髓腫細胞を根本的に治療する新しい未熟型骨髓腫細胞治療剤を提供するものである。より詳しくは、本発明はIL-6R抗体を有効成分とする未熟型骨髓腫細胞の生存阻害作用を有する未熟型骨髓腫細胞治療剤を提供する。さらに詳しくは、本発明はIL-6R抗体を有効成分とする未熟型骨髓腫細胞の生存阻害剤を提供する。

【0010】

【具体的な説明】本発明で使用されるIL-6レセプター抗体は、未熟型骨髓腫細胞のIL-6によるシグナル伝達を遮断し、IL-6の生物学的活性を阻害するものであれば、その由来および種類（モノクローナル、ポリクローナル）を問わないが、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。この抗体はIL-6Rと結合することにより、IL-6とIL-6Rの結合を阻害して、IL-6のシグナル伝達を遮断し、IL-6の生物学的活性を阻害する抗体である。

【0011】モノクローナル抗体の産生細胞の動物種は哺乳類であれば特に制限されず、ヒト抗体またはヒト以外の哺乳動物由来であってよい。ヒト以外の哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、その作成の簡便さからウサギあるいはげっ歯類由来のモノクローナル抗体が好ましい。げっ歯類としては、特に制限されないが、マウス、ラット、ハムスターなどが好ましく例示される。

【0012】このようなIL-6レセプター抗体としては、PM-1抗体（Hirataら、J. Immunol. 143:2900-2906, 1989）、AUK12-20抗体、AUK64-7抗体あるいはAUK146-15抗体（国際特許出願公開番号WO92-19759）などが挙げられる。モノクローナル抗体は、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作成できる。すなわち、IL-6Rを感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作成できる。

【0013】より具体的には、モノクローナル抗体を作成するには次のようにすればよい。例えば、前記感作抗原としては、欧州特許出願公開番号EP325474号に開示されたヒトIL-6Rの遺伝子配列を用いることによって得られる。ヒトIL-6Rの遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または、培養上清中から目的のIL-6Rタンパク質を精製し、この精製IL-6Rタンパク質を感作抗原として用いればよい。

【0014】IL-6Rは細胞膜上に発現しているものの他に細胞膜より離脱している可能性のもの（sIL-6R）が抗原として使用できる。sIL-6Rは細胞膜

に結合しているIL-6Rの主に細胞外領域から構成されており、細胞膜貫通領域あるいは細胞膜貫通領域と細胞内領域が欠損している点で膜結合型IL-6Rと異なっている。感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはマウス、ラット、ハムスター、ウサギ等が使用される。

【0015】感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物に腹腔内または、皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS（Phosphate-Buffered Saline）や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量併用して、哺乳動物に4-21日毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。

【0016】このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞が取り出され、細胞融合に付されるが、好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞は、すでに、公知の種々の細胞株、例えば、P3（P3x63Ag8.653）（J. Immunol. 123:1548, 1978）、p3-U1（Current Topics in Microbiology and Immunology 81:1-7, 1978）、NS-1（Eur. J. Immunol. 6:511-519, 1976）、MPC-11（Cell, 8:405-415, 1976）：SP2/0（Nature, 276:269-270, 1978）、FO（J. Immunol. Meth. 35:1-21, 1980）、S194（J. Exp. Med. 148:313-323, 1978）、R210（Nature, 277:131-133, 1979）等が好適に使用される。

【0017】前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は基本的には公知の方法、たとえば、ミルステインらの方法（Milsteinら、Methods Enzymol. 73:3-46, 1981）等に従って行うことができる。より具体的には、前記細胞融合は例えば、細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養中で実施される。融合促進剤としては例えば、ポリエチレングリコール（PEG）、センダイウィルス（HVJ）等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

【0018】免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1-1

10

20

30

40

50

0倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI 1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清(FCS)等の血清補液を併用することもできる。

【0019】細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め、37℃程度に加熱したPEG溶液、例えば、平均分子量1000-6000程度のPEG通常、培養液に30-60% (w/v) の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞(ハイブリドーマ)が形成される。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去できる。

【0020】当該ハイブリドーマは、通常の実験培養液、例えば、HAT培養液(ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液)で培養することにより選択される。当該HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞(非融合細胞)が死滅するのに十分な時間、通常数日〜数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローン化が行われる。

【0021】このようにして作成されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の実験培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に移植して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

【0022】さらに、前記の方法により得られるモノクローナル抗体は、塩析法、ゲル濾過法、アフィニティークロマトグラフィー法等の通常の実験手段を利用して高純度に精製することができる。このようにして、作成されるモノクローナル抗体は、放射免疫測定法(RIA)、酵素免疫測定法(EIA, ELISA)、蛍光抗体法(Immunofluorescence Analysis)等の通常の実験的手段により抗原を高感度かつ高精度で認識することを確認することができる。

【0023】本発明に使用されるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体に限られるものではなく、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変したものであってよい。例えば、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウスのモノクローナル抗体の可変領域とヒト抗体の定常領域と

からなるキメラ抗体を使用することができ、このようなキメラ抗体は、既知のキメラ抗体の製造方法、特に遺伝子組換え技法を用いて製造することができる。

【0024】さらに、再構成(reshaped)したヒト抗体を本発明に用いることができる。これはヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域によりヒト抗体の相補性決定領域を置換したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。その既知の方法を用いて、本発明に有用な再構成ヒト型抗体を得ることができる。

【0025】なお、必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク(FR)領域のアミノ酸を置換してもよい(Satoら、Cancer Res. 53:1-6, 1993)。このような再構成ヒト抗体としてヒト型化PM-1(hPM-1)抗体が好ましく例示される(国際特許出願公開番号WO92-19759を参照)。

【0026】さらには抗原に結合し、IL-6の活性を阻害するかぎり抗体の断片、たとえばFabあるいはFv、H鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv(scFv)をコードする遺伝子を構築し、これを適当な宿主細胞で発現させ、前述の目的に使用することができる。(例えば、Birdら、TIBTECH, 9:132-137, 1991; Hustonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5879-5883, 1988を参照)。

【0027】本発明のIL-6レセプター抗体を有効成分とする未熟型骨髓腫細胞治療剤は、未熟型骨髓腫細胞のIL-6のシグナル伝達を遮断し、IL-6により生存が維持された未熟型骨髓腫細胞の生存が阻害される限り、それらの未熟型骨髓腫細胞の根絶に有効である。本発明の未熟型骨髓腫細胞治療剤は、好ましくは非経口的に、たとえば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等により全身あるいは局部的に投与することができる。さらに、少なくとも一種の医薬用担体または希釈剤とともに医薬組成物やキットの形態をとることができる。

【0028】本発明の未熟型骨髓腫細胞治療剤のヒトに対する投与量は患者の病態、年齢あるいは投与方法により異なるが、適宜適当な量を選択することが必要である。例えば、およそ1-1000mg/患者の範囲で4回以下の分割容量を選択することができる。しかしながら、本発明の未熟型骨髓腫細胞治療剤はこれらの投与量に制限されるものではない。

【0029】本発明の未熟型骨髓腫細胞治療剤は常法にしたがって製剤化することができる。たとえば、注射用製剤は、精製されたIL-6R抗体を溶剤、たとえば、生理食塩水、緩衝液などに溶解し、それに、吸着防止剤、たとえば、Tween 80、ゼラチン、ヒト血清ア

ルブミン (HSA) などに加えただけであり、または、使用前に溶解再構成するために凍結乾燥したものであってもよい。凍結乾燥のための賦形剤としては例えばマンニトール、ブドウ糖などの糖アルコールや糖類を使用することができる。

【0030】

【実施例】以下、参考例、実験例および実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

参考例1. ヒトIL-6レセプター抗体PM-1の調製

Hirataらの方法 (J. Immunol., 143:2900-2906, 1989) により作成した抗IL-6R抗体MT18をCNBrにより活性化させたセファロース4B (Pharmacia Fine Chemicals製, Piscataway, NJ) と添付の処方にしたがって結合させ、IL-6R (Yamasakiら, Science 241:825-828, 1988) を精製した。

【0031】すなわち、ヒトミエローマ細胞株U266を1%ジギトニン (Wako Chemicals製)、10mMトリエタノールアミン (pH7.8) および0.15M NaClを含む1mM-pアラミノフェニルメタンスルフォニルフルオリドハイドロクロリド (Wako Chemicals製) (ジギトニン緩衝液) で可溶化し、セファロース4Bビーズと結合させたMT18抗体と混合した。その後、ビーズをジギトニン緩衝液で6回洗浄し、免疫に用いる部分精製IL-6Rとした。

【0032】BALB/cマウスを 3×10^5 個のU266細胞から得た上記部分精製IL-6Rで10日おきに4回免疫し、その後常法によりハイブリドーマを作成した。成長陽性ウェルからのハイブリドーマ培養上清を下記の方法にてIL-6Rへの結合活性を調べた。 5×10^7 個のU266細胞を35S-メチオニン (2.5mCi) で標識し、上記ジギトニン緩衝液で可溶化した。

【0033】可溶化したU266細胞を0.04ml容量のセファロース4Bビーズと結合させたMT18抗体と混合し、その後、ジギトニン緩衝液で6回洗浄し、0.25mlのジギトニン緩衝液 (pH3.4) により 35 S-メチオニン標識IL-6Rを流出させ、0.025mlの1M Tris (pH7.4) で中和した。0.05mlのハイブリドーマ培養上清を0.01mlのProtein Gセファロース (Pharmacia製) と混合した。

【0034】洗浄した後、セファロースを上記で調製した0.005mlの 35 S標識IL-6R溶液とともにインキュベートした。免疫沈降物質をSDS-PAGEで分析し、IL-6Rと反応するハイブリドーマ培養上清を調べた。その結果、反応陽性ハイブリドーマクローンP

M-1を樹立した。ハイブリドーマPM-1から産生されるIL-6R抗体PM-1は、IgG1 κ 型のサブタイプを有する。

【0035】ハイブリドーマPM-1が産生する抗体のヒトIL-6Rに対するIL-6の結合阻害活性をヒトミエローマ細胞株U266を用いて調べた。ヒト組換えIL-6を大腸菌より調製し (Hiranoら, Immunol. Lett., 17:41, 1988)、ボルトン-ハンター試薬 (New England Nuclear, Boston, MA) により 125 I標識した (Tagaら, J. Exp. Med. 166:967, 1987)。

【0036】 4×10^5 個のU266細胞を、100倍量の過剰な非標識IL-6の存在下で室温にて、1時間、70% (v/v) のハイブリドーマPM-1の培養上清及び14000CPMの 125 I標識IL-6とともに培養した。70 μ lのサンプルを400 μ lのマイクロフュージポリエチレンチューブに入れた300 μ lのFCS上に重層し、遠心の後、細胞上の放射活性を測定した。その結果、ハイブリドーマPM-1が産生する抗体は、IL-6のIL-6Rに対する結合を阻害することが明らかとなった。

【0037】参考例2. ヒト型抗体hPM-1の作成
ヒト型化抗体hPM-1を国際特許出願公開番号WO92-19759に記載の方法により得た。参考例1で作成されたハイブリドーマPM-1から常法で全RNAを調製し、これより一本鎖cDNAの合成を行った。ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法によりマウスPM-1のV領域のDNAを増幅した。PCR法に使用するプライマーは、S. T. Jonesら, Bio/Technology, 9, 88, 1991に記載されたものを用いた。

【0038】PCR法により増幅したDNA断片を精製し、マウスカッパ型L鎖V領域をコードする遺伝子を含むDNA断片、及びマウスガンマ型H鎖可変領域をコードする遺伝子を含むDNA断片を得た。これらのDNA断片をプラスミドpUC19に連結し、大腸菌DH5 α のコンピテント細胞に導入して大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体から上記プラスミドを得、プラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列を、常法にしたがい決定し、さらに各V領域の相補性決定領域 (CDR) を決定した。

【0039】キメラPM-1抗体を発現するベクターを作製するため、それぞれマウスPM-1 κ L鎖及びH鎖のV領域をコードするcDNAをHCMV発現ベクターに挿入した。ヒト型化ヒトPM-1抗体を作成するために、CDR移植法によりマウスPM-1のV領域CDRをヒト抗体へ移植した。ヒト型化抗体のCDRが適切な抗原結合部位を形成するように抗体の変換領域のフレームワーク (FR) 領域のアミノ酸を置換した。

【0040】このようにして作成したヒト型化PM-1抗体のL鎖およびH鎖の遺伝子を哺乳類細胞中で発現させるために、ヒトエロンゲーションファクター 1α (HEF- 1α) プロモーターを含有するベクターに各々導入し、ヒト型化PM-1抗体L鎖およびH鎖を発現するベクターを作成した。これら二つの発現ベクターをCHO細胞に同時に挿入することにより、ヒト型化PM-1 (hPM-1) を産生する細胞株を樹立した。得られたヒト型化抗体のヒトIL-6Rへの結合能はELISAにて確認した。さらに、hPM-1はマウス抗体およびキメラ抗体と同様に、ヒトIL-6のヒトIL-6Rへの結合を阻害した。

【0041】実験例

(1) 骨髄腫細胞の分類

骨髄腫患者から得た骨髄腫細胞を、フローサイトメトリー法を用い、表面抗原に基づく骨髄腫細胞の同定および分類を行った。骨髄液を、リンパ球分離液Separate-L (Muto Pure Chemicals Co.) により遠心分離し、単核細胞を分離した。

【0042】これらの骨髄腫細胞を $200\mu\text{g}/\text{ml}$ BSAおよび 0.01% NaN₃を含むPBSに 5×10^5 個/ $20\mu\text{l}$ となるように懸濁し、はじめに各々 $20\mu\text{l}$ の抗CD19モノクローナル抗体(mAB) (Immunotech社)、抗CD56mAB (Coulter社)、抗VLA-5mAB (Immunotech社)あるいは抗MPC-1mAB (特開平6-86688参照)を加え、 4°C にて30分間反応させた後、 20mM Sodium Phosphateおよび 0.25M NaClを含むPBS (pH7.2) で二回洗浄した。

【0043】次いで、100倍希釈した $40\mu\text{l}$ のPE (phycoerythrin) 結合ヤギ抗マウスIgG (Immunotech社製) にて染色 (4°C 、30分間) し、前記PBSにて二回洗浄の後、 $15\mu\text{l}$ のマウス血清 (Chemicon社) を加え、 4°C 、20分間インキュベートし、さらに $20\mu\text{l}$ の前記PBS中で $5\mu\text{l}$ のFITC (fluorescein isothiocyanate) 結合抗CD38mAB (Immunotech社製) を添加して染色し (4°C 、30分間)、前記PBSにて二回洗浄した。

【0044】これら二重染色された骨髄細胞をフローサイトメーター (EPICS ELITE, Coulter社) にて蛍光を測定することにより解析した。骨髄腫細胞の特徴であるCD38強陽性の画分中出现する細胞の表面抗原を解析した結果、骨髄腫細胞は、VLA-5⁺ MPC-1⁺ の成熟型、VLA-5⁻ MPC-1⁺ の中間型およびVLA-5⁻ MPC-1⁻ の未熟型に分けられた (Kawanoら、Blood, 82, 564, 1993)。

【0045】(2) 骨髄腫細胞のアポトーシス誘導

骨髄腫細胞の生存率および死細胞のアポトーシスの判定を、FDA (fluorescein diacetate, Aldrich Chem. Co. 製) およびPI (propidium iodide, Sigma社) を用いた二重染色フローサイトメトリー法 (Cancer Res., 49, 3776, 1989) にて解析し、図1にアポトーシス誘導した細胞の分布を機械的に示した。

【0046】ヒト骨髄腫細胞株KMS-5 (Ohtsukira, Acto. Haematol. Jpn., 51, 1052, 1988) を (1×10^6) 個/ ml となるように10% FCS添加RPMI 培養液培養液中で調製し、アポトーシスを誘導するdexamethasone (Sigma製) を $1\times 10^{-7}\text{M}$ となるよう添加した。 37°C にて培養24時間後にKMS-5細胞をFDA/PIにて二重染色し、フローサイトメーターで蛍光を測定した。その結果、図2に示すように、dexamethasone処理により生細胞画分 (FDA⁺ PI⁻) に加え、アポトーシスが誘導された細胞の画分 (FDA⁻ PI⁻) が出現した。

【0047】FDA⁺ PI⁻ 画分およびFDA⁻ PI⁻ 画分の細胞をフローサイトメトリーにて分取し、Br. J. Haematol., 71, 343, 1988の方法にしたがい、DNAを抽出した。このように調製したDNAを1.2%アガロースゲル電気泳動にて分析した。その結果、図3に示すようにFDA⁺ PI⁻ 画分の細胞由来のDNAは分解していなかったが、FDA⁻ PI⁻ 画分の細胞は、アポトーシスの特徴であるDNAの明らかな分解およびladder状のバンドがみられた。

【0048】実施例

実験例に記載のFDA/PI二重染色フローサイトメトリー法により患者骨髄腫細胞のin vitroにおける生存率の変化を検討した。上記実施例と同様の方法にて、PE結合抗VLA-5抗体およびPE結合抗MPC-1抗体により、骨髄腫細胞を染色し、以下の細胞群を分取した。分取したVLA-5⁺ MPC-1⁺ の成熟型、VLA-5⁻ MPC-1⁺ の中間型およびVLA-5⁻ MPC-1⁻ の未熟型の骨髄腫細胞を 1×10^6 個/ ml となるよう10% FCSおよび $1\times 10^{-5}\text{M}$ の2-メルカプトエタノールを含むRPMI 培養液中に浮遊させ、 $35\times 10\text{mm}$ のtissue cultured dish (Falcon社) に分注した。

【0049】これらの細胞を、 $20\text{U}/\text{ml}$ の組換え型ヒトIL-6 (rIL-6; Hiranoら、Nature, 324, 73, 1986)、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のヒト型化抗hIL-6レセプター抗体 (hPM-1) 存在あるいは非存在下にて 37°C で3日間培養した後、FDA/PIを用いてフローサイトメーター (EPICS ELITE, Coulter社) により蛍光を測定し、生細

胞の比率を求めた。なお、コントロールは、rIL-6 *【0050】
およびhPM-1非存在下で培養した。その結果を表1【表1】
に示す。 *

表1 骨髓腫細胞の生存率に関するhPM-1の効果

患者由来 骨髓腫細胞	表面抗原	生存細胞の比率(%)			
		コントロール	rIL-6	hPM-1	rIL-6+hPM-1
1	VLA-5 ⁺ MPC-1 ⁺	40.5	39.2	41.7	40.9
2	VLA-5 ⁺ MPC-1 ⁺	12.8	13.0	14.5	14.1
3	VLA-5 ⁺ MPC-1 ⁺	11.5	12.2	10.9	10.7
4	VLA-5 ⁺ MPC-1 ⁺	35.2	36.0	33.8	32.5
5	VLA-5 ⁺ MPC-1 ⁺	40.0	40.8	39.0	47.9
6	VLA-5 ⁺ MPC-1 ⁺	42.5	45.0	40.4	42.4
7	VLA-5 ⁺ MPC-1 ⁻	17.1	15.5	15.7	15.2
8	VLA-5 ⁺ MPC-1 ⁺	30.3	31.5	31.0	30.8
9	VLA-5 ⁺ MPC-1 ⁺	5.0	10.7	6.2	8.1
10	VLA-5 ⁻ MPC-1 ⁺	8.8	11.3	9.1	10.0
11	VLA-5 ⁻ MPC-1 ⁺	10.5	35.0	10.2	20.6
12	VLA-5 ⁻ MPC-1 ⁺	4.7	12.4	6.1	10.5
13	VLA-5 ⁻ MPC-1 ⁻	4.3	24.8	9.5	15.7
14	VLA-5 ⁻ MPC-1 ⁻	11.0	26.5	12.5	18.3
15	VLA-5 ⁻ MPC-1 ⁻	6.1	13.1	6.5	11.5
16	VLA-5 ⁻ MPC-1 ⁻	17.2	40.8	12.0	29.8
17	VLA-5 ⁻ MPC-1 ⁻	8.5	23.3	7.9	8.6
18	VLA-5 ⁻ MPC-1 ⁻	4.7	24.6	4.0	7.7

生存細胞の比率(%)は、FDA/PI二重染色によるフローサイトメトリー法により算出した。

【0051】さらに、これらの結果から、成熟型、中間形および未熟型の骨髓腫細胞の生存率にrIL-6が及ぼす影響を図4に示す。VLA-5⁻MPC-1⁻の表面抗原を有する未熟型骨髓腫細胞のrIL-6反応性とそれに対するhPM-1抗体の作用を図5に示した。VLA-5⁺MPC-1⁺の成熟型骨髓腫細胞(表1中、患者由来骨髓腫細胞1-9)は培養液のみでも比較的高い生存率を保った。これら成熟骨髓腫細胞は、rIL-6にほとんど反応せず、hPM-1抗体による生存阻害効果もみられなかった。一方、VLA-5⁻MPC-1⁻の未熟型骨髓腫細胞(表1中、患者由来骨髓腫細胞13-18)は培養液のみでは生存が維持できず、アポトーシスに陥り易いことが示された。

【0052】これらの細胞はIL-6に対する反応性が高く、rIL-6により生存率が上昇した。この時、rIL-6による未熟型骨髓腫細胞の生存維持効果は、hPM-1抗体により明らかに阻害された(図5)。コントロール、rIL-6、hPM-1およびrIL-6とhPM-1各存在下における未熟型骨髓腫細胞(表1中、患者由来骨髓腫細胞17)のFDA/PI二重染色像を図6に示す。

【0053】コントロールに比べ、rIL-6添加群では、アポトーシスを誘導した像(左下、D)の強度が低く、生細胞(右下、E)の割合が大きかった。これに対し、rIL-6およびhPM-1存在下では、アポトーシスを誘導した細胞の画分(左下、D)の強度が高かった。VLA-5⁻MPC-1⁺を示す中間型骨髓腫細胞

も、未熟型と同程度ではなかったが、rIL-6に反応して生存率が上昇することおよびこの作用がhPM-1により阻害されることが示された。

【0054】

【発明の効果】治療抵抗性を示すことが多い骨髓腫細胞集団の主体をなす、表面抗原VLA-5⁻MPC-1⁻の未熟型骨髓腫細胞の生存維持にはIL-6が深く関わっている。IL-6レセプター抗体による未熟型骨髓腫細胞の生存阻害作用が、VLA-5⁻MPC-1⁻未熟型骨髓腫細胞で強く認められたことから、本発明のIL-6レセプター抗体は未熟型骨髓腫細胞治療剤としての有用性が示唆された。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、二重染色フローサイトメトリー法による、アポトーシスを誘導した骨髓腫細胞の分布を模式的に示す。Eは生細胞(FDA⁺PI⁻)、Dはアポトーシス誘導細胞(FDA⁻PI⁻)、Cはアポトーシスの特徴を有さない死細胞の像である。

【図2】図2は、デキサメタゾン処理によりアポトーシスが誘導された骨髓腫細胞株KMS-5のフローサイトメトリー像である。

【図3】図3は、FDA⁺PI⁻(E)およびFDA⁻PI⁻(D)画分の細胞のDNAアガロースゲル電気泳動図である。レーン1は分子量マーカー、レーン2はFDA⁺PI⁻(E)画分、レーン3はFDA⁻PI⁻(D)画分である。レーン3でDNAの分解およびアポトーシスの特徴であるladder状のバンドがみら

れる。

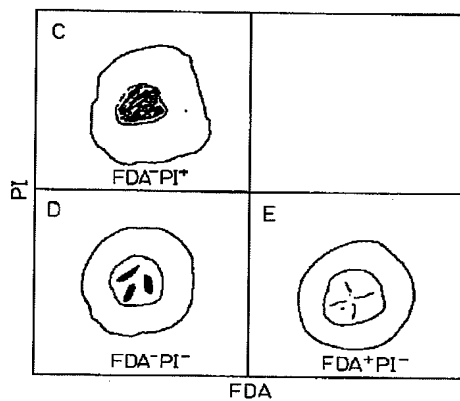
【図4】図4は、骨髓腫細胞の生存率にIL-6が及ぼす影響を示す。IL-6存在下において、感熱型骨髓腫細胞(VLA-5⁺ MPC-1⁺)はほぼその存在に影響を受けない(約1.1倍)。一方、中間型(VLA-5⁻ MPC-1⁺)および未熟型骨髓腫細胞(VLA-5⁻ MPC-1⁻)は各々約2.4倍、3.5倍の生存細胞数の増加がみられる。

【図5】図5は、VLA-5⁻ MPC-1⁻の未熟型骨髓腫細胞のIL-6に対する反応性と、それに対するh*10

*PM-1抗体の作用を示す。○は表1中の患者由来骨髓腫細胞13、□は同14、△は同15、●は同16、×は同17、▼は同18を示す。これらの未熟型骨髓腫細胞の生存はIL-6により支持され、その生存支持効果をhPM-1抗体が明らかに阻害する。

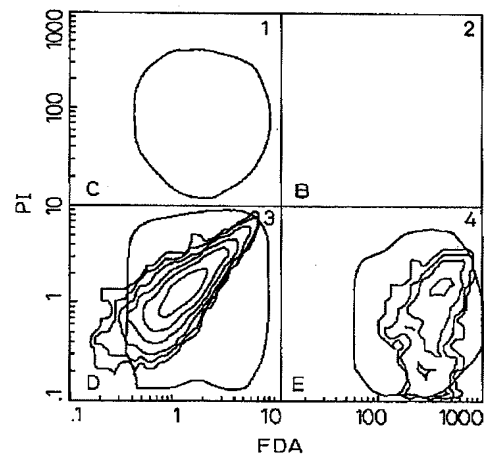
【図6】図6は、VLA-5⁻ MPC-1⁻の未熟型骨髓腫細胞(表1中、患者由来骨髓腫細胞17)のコントロール、rIL-6、hPM-1およびrIL-6とhPM-1の各存在下におけるFDA/PI二重染色像を示す。

【図1】



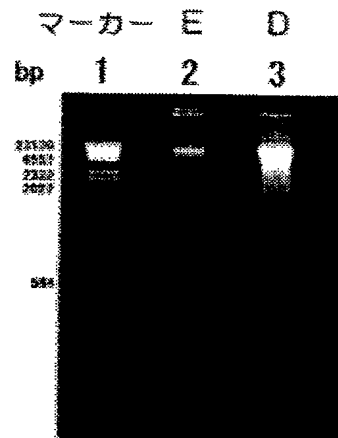
C: 死細胞
D: アポトーシス誘導細胞
E: 生細胞

【図2】



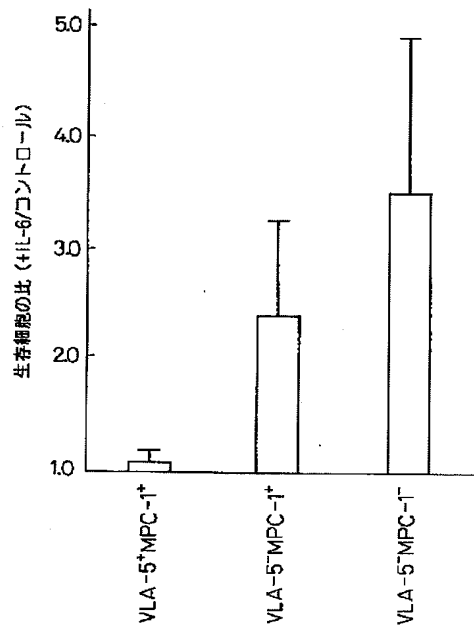
【図3】

図面代辯写真

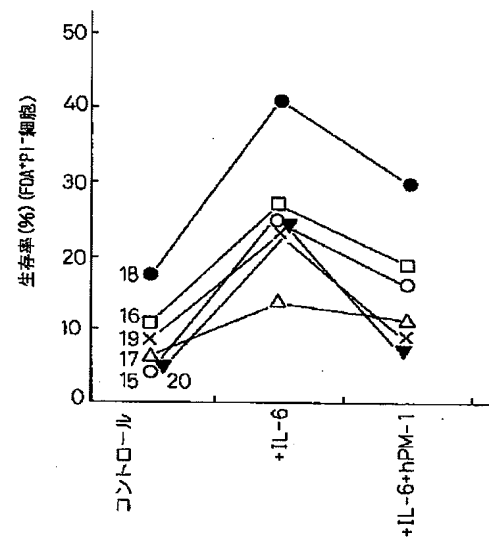


写真

【図4】



【図5】



【図6】

